1935

Aus dem Veterinärhygienischen und Tierseuchen-Institut
der Universität Gießen.
Direktor: Professor Dr. W. Zwick.

Lane Medical Library

Beitrag zur Kenntnis der kulturellen Merkmale der Tuberkelbakterien und der verwandten säurefesten Saprophyten.

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Veterinärmedizinischen Fakultät
der Hessischen Ludwigs-Universität
zu Gießen

vorgelegt von
GOTTFRIED HEMMERT-HALSWICK
aus Gahlen.

GIESSEN 1935

DISSERTATIONS-VERLAG G. H. NOLTE DÜSSELDORF

Gedruckt mit Genehmigung
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Gießen

Referent: Prof. Dr. Zwick.

EINLEITUNG.

Nach Einführung der Säurevorbehandlung von tuberkuloseverdächtigem Material zum Zwecke der Abtötung der Begleitbakterien (Löwenstein: 1920, Sumiyoshi: 1924, Hohn: 1926) ist der kulturelle Nachweis der Tuberkelbakterien [1]) durch Verbesserung der Nährböden nahezu ebenso sicher geworden wie der Tierversuch. Dementsprechend wird das Kulturverfahren vielfach angewandt. Da die Säure nun nicht alle Begleitbakterien abtötet, stören namentlich die säureresistenten Saprophyten wegen ihrer häufig sehr großen Ähnlichkeit mit den Tbb. Hier eine scharfe Abgrenzung zu finden und verschiedene biologische Merkmale der Tbb. zu untersuchen, wurde mir zur Aufgabe gemacht. Vor allem sollte das von L. Lange beobachtete Zonenwachstum der verschiedenen Typen der Tbb. geprüft werden.

II. LITERATURÜBERSICHT.

1. Über das Zonenwachstum der Tuberkelbakterien.

Über das Zonenwachstum der Tbb. ist bis jetzt noch sehr wenig berichtet worden. Zuerst hat L. Lange (1933) darauf aufmerksam gemacht, daß die humanen Tbb. bei Züchtung in einem Sautonnährboden (hohe Schicht) ½—2 mm breite zarte, leicht trübe Atmungsringe etwa 10 mm unter der Oberfläche bilden. Bei den bovinen Tbb. rücken die durch Koloniebildung entstandenen Trübungsringe näher an die Oberfläche. Die Geflügeltbb. wachsen von der Oberfläche ab bis zu einer scharfen Grenze 7—10 mm unterhalb, während sich die säurefesten Saprophyten [2]) nur auf der Oberfläche und in der oberen Nährbodenschicht vermehren. L. Lange folgert daraus, daß „für die Tbb. die normale Sauerstoffspannung nicht optimal, sondern daß sie, und zwar nach den bisherigen Feststellungen bei humanen Bazillen mehr, bei bovinen weniger, eine Herabsetzung der Sauerstoffspannung als optimal erkennen lassen." Er hält die Methode für geeignet, die oft schwierige Abgrenzung der Geflügeltbb. von den in ihrem morphologischen und kulturellen Verhalten ver-

1) Tuberkelbakterien = Tbb.
2) säurefeste Saprophyten = s. S.

wandten s. S. zu erreichen. Dieses Verhalten der säurefesten Bakterien bestätigen P. Kallos und L. Kallos-Deffner (1935) bei ihren Nachprüfungsversuchen.

Der Schlußfolgerung von L. Lange stehen nun Erfahrungen gegenüber, die namentlich in mehr oder weniger lange zurückliegenden Arbeiten gesammelt wurden. In einer früheren Veröffentlichung von L. Lange (1928) gibt er selbst an, daß die humanen Tbb. auf mehr, die bovinen auf weniger und die Geflügeltbb. auf noch geringere Sauerstoffzufuhr auf Grund ihres Verhaltens im Tierkörper, wo sie mehr oder weniger sauerstoffhaltige Gewebe aufsuchen, angewiesen sind. Nach Kirchner (1928) ist eine Sauerstoffspannung von etwa 45% und nach Novy und seinen Mitarbeitern (cit. nach L. Lange: 1928) von 40—50% optimal für Tbb. vom Typus humanus, während andere das beste Wachstum bei gutem Gasaustausch erhielten (Helm: 1933, Wolters und Dehmel: 1932, Dahmen: 1932). Demgegenüber konnte Witte (1935) bei Untersuchungen mit bovinen Tbb. keine Überlegenheit der Röhrchen, bei denen ein guter Gasaustausch stattfindet, über die verschlossenen Röhrchen feststellen. Nach Riemsdijk (1930) gewöhnen sich die Tbb. an eine bestimmte Sauerstoffspannung.

Einen bedeutenden Einfluß übt der Wasserstoffjonengehalt des Nährbodens auf die Atmung der Tbb. aus. Dieckmann und Mohr (1933) stellten den Sauerstoffverbrauch bei verschiedenen pH-Werten in Form einer Kurve dar, die 2 Maxima (bei pH = 6,4 und pH = 8) und ein Minimum (bei pH = 7,6) aufwies. Die Kurve fiel nach der sauren Seite vom Maximum stark, nach der alkalischen langsam ab. L. Lange (1933) stellte eine Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauches von der Reaktion des Nährbodens fest, er fand den größten Sauerstoffverbrauch bei pH = 6,4.

Nach Braun (1930), der sich mit dem Stoffwechsel der Bakterien eingehend beschäftigt hat, ist das Zonenwachstum von dem Sauerstoff, dem Kohlenstoff- und Wasserstoffionengehalt des Nährbodens, der Menge der Einsaat und der Temperatur wesentlich abhängig. Braun und Guggenheim (1932) nehmen auf Grund von Versuchen das Vorhandensein verschiedener Atmungsfermente an, die durch bestimmte Konzentration von Kaliumcyanid beeinflußt werden. Dementsprechend entstehen je nach der Konzentration des Kaliumcyanids Atmungsringe in verschiedenen Höhen des Nährbodens.

2. Über die Kolonieformen der Tuberkelbakterien.

Schon seit längerer Zeit sind Unterschiede im Verhalten der verschiedenen Typen der Tbb. hinsichtlich der Kolonieformen auf flüs-

sigen und festen Nährböden bekannt (Kossel, Weber und Heuss 1904/05 cit. Zwick 1908), nachdem schon vorher R. Koch und Schütz (1902) die verschiedenen pathogenen Eigenschaften der Menschen- und Rindertbb. bei Kälbern, Schweinen und Schafen festgestellt hatten. Die englische Kommission (1911) bezeichnet das Wachstum der humanen Tbb. als eugonisch, das der bovinen Tbb. als dysgonisch. Während der humane Typus eine mehr und mehr an Dicke zunehmende Oberflächenhaut von brüchiger Beschaffenheit, die an der Glaswand hinauf klettert, bildet, zeigt der bovine Typus nur ein Netz- oder schleierartiges Häutchen auf der Glyzerinbouillon.

Maffucci (1892) machte zuerst auf gewisse kulturelle Unterschiede der Geflügeltbb. und Säugetiertbb. aufmerksam. Auf schräg erstarrtem Serum bilden diese nach 18 Tagen kleine, weiße, an Wachsflecken erinnernde Kolonien, die „an Oberfläche und Dicke zunehmen", zusammenfließen und einen weißen speckigen Belag bilden. Die Säugetiertbb. haben nicht die Neigung „zur Entwicklung in der Oberfläche, sondern in der Dicke" und wachsen auf koaguliertem Blutserum wie graue Nadelköpfe. Die besondere Art des Oberflächenwachstums der Geflügeltbb. bestätigen Weber und Bofinger (1904) bei ihren eingehenden Untersuchungen.

Die Möglichkeit der einwandfreien Differenzierung der verschiedenen Typen der Tbb. auf dem Petragnani-Einährboden hat Wolters (1930) hervorgehoben. Die Angaben wurden von Helm (1932) und Flückiger (1933) bestätigt. Auch Hohn (1931) führte eine Differenzierung von humanen und bovinen Tbb. auf seinem Z-Einährboden durch. Aber in allen Fällen kann man doch nicht eine sichere Entscheidung fällen.

Interessant sind die Studien über die ersten Teilungen und den Beginn der Kolonienbildung der Tbb. und anderer Mykobakterien, wie sie von Miehe (1909), Oerskov (1923) und (1932), Gardner (1929) und A. Mayer (1934) bekanntgegeben worden sind. Sie geben uns eine Vorstellung, wie die älteren Kolonien entstanden sind. Miehe untersuchte das Wachstum der Tbb. und sah im hängenden Tropfen die ersten beiden Zellen eine geknickte Linie bilden. Im weiteren Wachstum schieben sich die Bakterien aneinander vorbei und schmiegen sich eng aneinander an, wobei sie nach den Raumverhältnissen gebogen sind. Das seitliche Ausbiegen im weiteren Verlauf der Zellteilung ist immer wieder zu beobachten.

Etwas anders sahen Oerskov und Gardner die Vermehrung der Zellen vor sich gehen. Oerskov benutzte synthetische Nährlösung nach Sauton mit 2%igem Agarzusatz, während Gardner humane Tbb. auf Agar mit einem Zusatz von 20—25% frischem menschlichem Serum züchtete. Grundsätzlich sahen beide

bei allen Mykobakterien denselben Vermehrungsmodus, das sogenannte Winkelwachstum.

Oerskov beschreibt die Geflügeltbb. in der Kultur folgendermaßen: Die kurzen Stäbchen werden auf den Plattennährboden dicker, länger und lichtbrechender. Nach 3—4 Tagen fangen die ersten langen, schlanken Stäbchen nahe der Mitte sich zu teilen an und bilden größere und kleinere Winkel zueinander. Dann sieht man eine Sprossung des einen oder beider Elemente an der Teilungslinie. Die heraussprossende Partie ist dünner. So entstehen V, -Y-, H-Formen. Wenn die Teilung vollständig ist, so laufen die Stäbchen parallel. Später werden die Figuren komplizierter. Alle drei Autoren haben ihre Beobachtungen über die verschiedenen Stadien der Zellvermehrung durch Zeichnungen belegt, die einander sehr ähnlich sind.

Bemerkenswert ist es, daß die Faden- und Kettenbildung der Tbb. häufig beschrieben worden ist. Schon 1898 sahen Ledoux-Lebard die Fadenbildung der Tbb. von Typus humanus und gallinaceus bei ihrem Wachstum im hängenden Tropfen, ohne wesentliche Unterschiede bei den Typen feststellen zu können. Wolters und Dehmel (1930) fanden bei der mikroskopischen Prüfung des Bodensatzes der Besredka-Bouillon die humanen und bovinen Tbb. in großen dichten Haufen liegen und ein verschlungenes Netzwerk bilden, während sich die Geflügeltbb. einzeln oder in kleinen Verbänden gleichmäßig über das ganze Gesichtsfeld verteilten. Van Riemsdijk (1930) sah die humanen Tbb. in der Tiefe auch zu Kettengebilden angeordnet. Kuhn (1932) gibt ebenfalls an, daß Fontès, Plasy Armengol und Vaudremer Fadenbildungen bei Tbb. sahen. Sanfelice (1925) fand in den Tuberkeln eines mit menschlichen Tbb. in die Bauchhöhle infizierten Igels die Bakterien in Form von langen Ketten, die teilweise Verzweigungen aufwiesen.

W. Seiffert (1932) beobachtete verschiedenartiges Wachstum von bovinen Stämmen auf flüssigem Nährboden; unter anderem sah er ein netzartiges Oberflächenwachstum, das makroskopisch als ein transparenter homogener Belag oder als eine feine z. T. derb strukturierte Haut erschien. Mikroskopisch ergab sich der homogene Belag als ein Gebilde mit dichtem Zentrum, von dem ein reichliches Fadenwerk ausging. Auch Vollum (1932) stellte makroskopisch bei 2 Rinder- und 2 BCC-Stämmen auf flüssigem Nährboden ein zartes geädertes Häutchen, mikroskopisch milzbrandähnliche gewundene Ketten von Stäbchen, in der Tiefe der Kultur lange Ketten fest.

Besonders interessant sind die Arbeiten von van Riemsdijk (1933 und 1934) im Zusammenhang mit meinen Feststellungen. Auf dem für Tbb. ungünstigen Glyzerinagarnährboden züchtete er meh-

rere humane Tbb.-Stämme und beobachtete 5 verschiedene Wachstumsarten; vor allem zeigten sich 3 Kolonietypen, eine „grobe", eine „feine" und eine sogenannte „Plakatform". Während die grobe Form braun pigmentiert war, Falten aufwies und das ganze Gesichtsfeld einnahm, zeigte die feine Form ein zartes grauweißes Gewebe mit einem kleinen Kern und einem mit Spitzen besetzten Rand. Zu der feinen Form kann man den Kolonietypus rechnen, der wie eine Spinne aussieht. Van Riemsdijk beschreibt einen Entwicklungszyklus, wonach sich die Ausläufer bei den spinnenförmigen Kolonien verlieren und nur noch der stachlige Rand bleibt. Bei Weiterzüchtung der verschiedenen Kolonietypen zeigten sich immer wieder zwei Grundtypen, der spinnenartige und der grobe Typus.

3. Über die Wirkung der Zucker, Alkohole und organischen Säuren auf das Wachstum der Tuberkelbakterien.

Auf der Suche, das Glyzerin durch Zucker, organische Säuren oder Alkohole zu ersetzen, hat man noch keine gleichwertigen geeigneten Chemikalien gefunden. Traubenzucker allein könnte das Glyzerin noch am ehesten ersetzen, aber gleichwertig ist er dem Glyzerin nicht. In diesem Sinne sprechen sich alle Forscher aus, wobei im allgemeinen mit humanen Tbb. gearbeitet wurde. (Proskauer und Beck: 1894, Miehe: 1909, Braun und Seigo-Kondo: 1924, Frouin und Guillaumie: 1924, Kauffmann: 1933, P. Kallos und L. Kallos-Deffner: 1935). Eine gute Förderung des Wachstums der Tbb. durch Traubenzucker auf Nährböden, die sonst noch Kohlenstoffquellen enthielten, erzielten Alessandrini (1927), Henley (1929), Wahly (1932) und Dahmen (1933), während Matthies (1928) bei Zusatz von Traubenzucker zum Hohnschen Nährboden keine Beeinflussung des Wachstums der Tbb. sah.

Wohl sind eine Reihe von Zuckern und Alkoholen bei Gegenwart einer passenden Kohlenstoffquelle mehr oder weniger geeignet, das Wachstum der Tbb. zu fördern und als Kohlenstoffquelle zu dienen (Proskauer und Beck: 1894, Braun und Seigo-Kondo: 1924, Frouin und Guillaumie: 1924). Die ersten Untersuchungen stammen von Proskauer und Beck, die einem sythetischen Nährboden einmal 1,5% Glyzerin, dann 0,075% Traubenzucker zusetzten. Bei Zusatz von 1,5% Glyzerin eigneten sich Mannose, Saccharose, Maltose, Raffinose, Isodulzit, Mannit und Dulzit, weniger Laevulose. Bei Zusatz von 0,075% Traubenzucker förderten Isolduzit, Mannose, Milchzucker und Dextrin, besserLaevu-

lose und am besten Stärke das Wachstum der Tbb. Während sich auf den Nährböden mit einer ganzen Reihe von Zuckern und Alkoholen nur ein mäßiges Wachstum zeigte. Nach Frouin und Guillaumie (1924) können außer Traubenzucker auch Maltose und Mykose als gute Kohlenstoffquellen dienen. Während unter denselben Bedingungen bei Zusatz von Sacharose, Laktose und Laevulose nur eine geringe Vermehrung der Tbb. stattfindet. Die Beurteilung des Wachstums durch die beiden letztgenannten Forscher fand in der Weise statt, daß sie jedesmal das Gewicht der getrockneten Bakterien sowie auch den jeweiligen Verbrauch an Chemikalien durch die Tbb. feststellten. Braun und Seigo Kondo (1924) fanden die Essigsäure als Kohlenstoffquelle geeignet, die Milchsäure dagegen nicht.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN.

A. Übersicht über das Untersuchungsmaterial.

Als Untersuchungsmaterial dienten mir einerseits die bei den laufenden Untersuchungen herausgezüchteten säurefesten Bakterienstämme, anderseits die Sammlungsstämme. Die 19 bovinen Stämme wurden hauptsächlich als erste Subkulturen und nur wenige Male als zweite Subkulturen verwandt. Die acht humanen Stämme sind jüngere und ältere Sammlungsstämme, die aus menschlichem und tierischem Material gezüchtet worden sind, mit Ausnahme des Stammes 56, der eine erste Subkultur darstellte. Von den 11 Geflügeltbb.-Stämmen sind 8 3—4jährige Sammlungsstämme, während 3 erste Subkulturen sind, die von tuberkulösem Hühnermaterial stammen.

Alle Tbb.-Stämme zeigten bei der Prüfung in Besredka-Bouillon ihr typisches Wachstum. Die Säugetiertbb. bildeten nämlich beim Aufschütteln einen bröckligen, die Geflügeltbb. einen zopfartigen schleimigen Bodensatz.

Die s. S.-Stämme wurden ausschließlich auf Petragnani-Nährboden aus verdächtigen Milch- und Lungenschleimproben isoliert, wo sie sich nach ein paar Tagen oder erst nach Wochen zeigten; häufig entstand nur eine Kolonie. Die Kulturen wurden sofort in den Versuch genommen.

Um die saprophytische Natur der Stämme nachzuweisen, wurden sie außer bei 38° C auch noch bei Zimmertemperatur auf Agar, in gewöhnlicher Bouillon und auf Petragnani-Einährböden, modifiziert nach Witte, mit und ohne Glyzerin gezüchtet. (Ganz einwandfrei ist die Methode nicht, da sich auch die zur Kontrolle

bei Zimmertemperatur (20—25° C) gehaltenen humanen und Geflügeltbb. (je ein Stamm) auf diesen Einährböden, allerdings erst nach langer Zeit, vermehrten. Nur das Wachstum des Geflügelstammes war nach vier Wochen gut. Der humane Stamm zeigte zu diesem Zeitpunkt spärliche Kolonien, und der bovine ließ überhaupt keine Koloniebildung erkennen.) Auf den Einährböden gingen alle s. S. an, ebenfalls in Bouillon mit einer Ausnahme (Stamm 9) bei Zimmertemperatur. Aber bei 38° C und bei Zimmertemperatur blieb auf Agar das Wachstum von 4 Phleum-Stämmen aus.

Die s. S. wurden auf Grund ihres Verhaltens auf den angewandten Nährböden, ihrer Morphologie und vor allem ihrer Oberflächenkolonien auf Sautonagar, die später beschrieben werden, nach den Angaben von Lehmann und Neumann (bakteriologische Diagnostik 1926 und 1927) eingruppiert. Danach zeigten 10 von den 20 s. S.-Stämmen die Merkmale des Mycobacterium lacticola. Auf beiden Petragnani-Einährböden erscheinen schon nach wenigen Tagen üppige, gelbweiße, gelbliche oder grauweiße Kolonien, die bald auf der ganzen Oberfläche einen streuselkuchenartigen, trockenen oder feuchten Belag bilden. Einige Stämme (Stamm 1, 6 und 37) wuchsen bei Brutschranktemperatur trocken und bei Zimmertemperatur feucht. Ob es sich nun um Mycobacterium lacticola planum oder perugosum handelt, kann man erst an Hand der Oberflächenkolonien in Plattenkulturen entscheiden. (Vgl. III D.)

Weiter wurden 9 Stämme von Mycobacterium phlei festgestellt. Sie fallen durch ihre Orangefärbung auf und wachsen im allgemeinen langsam (erstes sichtbares Wachstum nach 5—10 Tagen bis zu mehreren Wochen), allerdings im Brutschrank etwas schneller. Jedoch verdient hervorgehoben zu werden, daß einzelne Kolonien bei Züchtung aus tierischem Material, in dem sie eine Verunreinigung darstellen, erst nach wochenlangem Brutschrankaufenthalt sichtbar werden können. Im wesentlichen bilden sie zuerst halbkugelige, feine, glatte, glänzende Kolonien, die sich mit der Zeit ausbreiten und dann einen höckerigen oder ebenen, dicken, saftigen, orangefarbenen Belag bilden. Meistens ist das Wachstum auf glyzerinhaltigem Nährboden besser als auf glyzerinfreiem. Dann zeichnen sich die Phleum-Stämme durch die Bildung einer wechselnden Menge eines gelben, schleimigen Bodensatzes in der sonst klaren Bouillon aus, während bei den anderen s. S. der Bodensatz bröcklig ist.

Für eine Differenzierung gab das Wachstum der s. S. in der Besredka-Bouillon keine festen Anhaltspunkte, da die Phleumstämme teils schleimig, teils bröcklig, die Lacticola-Stämme nur bröcklig wuchsen.

Nur einen Stamm (35) konnte ich nicht genau bestimmen. Im gefärbten Ausstrichpräparat waren die Stäbchen von verschiedener

Dicke, kurz bis mittellang, gut säurefest; sie lagen in kleinen Häufchen zusammen. Auf glyzerinhaltigem Einährboden wuchs der Stamm bei 38° C als rötlicher, dicker, höckeriger, mäßig feuchter Belag, während er auf demselben Nährboden bei Zimmertemperatur einen farblosen, dünnen Belag bildete. Besser war sein Wachstum auf dem glyzerinfreien Nährboden sowohl bei Zimmer- als auch bei Brutschranktemperatur, wo die Kultur gelblich aussah. Von seinen besonderen Oberflächenkolonien auf Plattenkulturen wird später berichtet werden.

Außerdem wurden zur Prüfung ihrer pathogenen Wirkung die 20 s. S.-Stämme an Meerschweinchen und 17 Stämme an Kaninchen subkutan verimpft. 2 Stämme, die große Ähnlichkeit mit den Geflügeltbb. hatten, wurden intravenös auf Tuberkulin nicht reagierenden, gesunden Hühnern eingespritzt. Eine Erkrankung trat bei keinem der Tiere ein. Nur riefen 5 Phleumstämme (von 6) und 3 Lacticola-Stämme (von 10) beim Kaninchen, und 4 Phleum-Stämme (von 9), auf die auch die Kaninchen reagiert hatten, beim Meerschweinchen einen Impfabszeß hervor. In dem rahmartigen und einmal trockenkrümeligen Eiter konnten die häufig phagocytierten säurefesten Stäbchen, die hier eine feine, schlanke Form angenommen hatten, in wechselnder Menge festgestellt werden. Nur im Abszeßeiter von einem Kaninchen und von einem Meerschweinchen, die mit ein und demselben Stamme geimpft worden waren, fanden sich überhaupt keine Keime mehr.

Auf Geflügel- und Rindertuberkulin reagierten bei der kutanen Probe die Hälfte der Tiere mehr oder weniger positiv. Mit der Schiebelehre nach R. Stenius konnten Dickenzunahmen der Haut bis zu 2 mm gemessen werden. Bei 3 Tieren war die Impfstelle mit einem weiten roten Hof umgeben. In der Mehrzahl der Fälle verhielten sich die Tiere, die mit demselben Stamm geimpft worden waren, nicht gleichmäßig.

Aus den Versuchen geht hervor, daß sich unter den s. S. erwartungsgemäß pathogene Stämme nicht befanden. Die geringe tuberkulinogene Wirkung der s. S. im Tierversuch entspricht der allgemeinen Erfahrung, die in ähnlichen Versuchen gemacht wurden.

B. Technik.

1. Herstellung der Nährböden.

Zuerst wurde der Sauton-Nährboden nach den kurzen Angaben von L. Lange im Zentralblatt f. Bakt., Orig., Bd. 127, S. 10, 1933, hergestellt. Später konnte durch die freundlichen brieflichen Mitteilungen von Herrn Ob.-Reg.-Rat L. Lange an Herrn Professor Zwick der Nährboden so hergestellt werden, wie er ihn

verwandt hat. Im Laufe der Versuche wurden die Nährböden durch Fortlassen des Glyzerins und Ersatz durch verschiedene Zucker modifiziert und die verschiedenen Nährböden mit Nummern gekennzeichnet.

Die Nährböden sind wie folgt zusammengesetzt:

Nährboden Nr. 1.

(nach den Angaben von L. Lange, Zbl. f. Bakt., Orig. I, Bd. 127, S. 10, 1933).

Asparagin (Merck)	8,0
Acid. citric. puriss. albiss. cryst. (Merck)	4,0
Kalium phosphoric. bibas. (K_2HPO_4) (Schering-Kahlbaum A.G., Berlin)	1,0
Magnesium sulfuric. pro anal. (Schering-Kahlbaum A.G., Berlin)	1,0
Ferrid. Ammonium citric. fusc. in lamellis (Merck)	0,5
gesättigte wässrige Neutralrotlösung	1,2
Glyzerinum bildest. puriss.	60,0
Agar	10,0
Aqua dest.	940,0

Das Asparagin und die Salze werden in möglichst wenig Wasser (ca. 200,0) der Reihe nach gelöst und dann das Glyzerin und die Neutralrotlösung hinzugefügt. Wenn der Agar in dem anderen Teile des Wassers aufgequollen und verflüssigt worden ist, werden beide Lösungen zusammengegossen und möglichst heiß filtriert. Weiter wird durch Zusatz von Natronlauge mit dem Apparate nach Dr. Georg Röder (Dr. N. Geber's Co. m. b. H., Leipzig C 1) auf einen pH-Wert von 6,4 eingestellt und in Reagenzröhrchen zu je 10 ccm abgefüllt. Die Sterilisierung erfolgt eine halbe Stunde lang im Autoklaven bei 110° C. Vor Beimpfen wird der Nährboden verflüssigt auf 45° abgekühlt und 0,5 ccm Rinderserum jedem Röhrchen hinzugefügt.

Dieser Nährboden wurde viermal hergestellt.

Nährboden Nr. 2.

Herstellung wie Nr. 1, nur wird hier das Glyzerin durch dieselbe Menge Aqua dest, ersetzt.

Nährboden Nr. 3.

(nach der ersten nicht eingehenden Mitteilung von L. Lange) besteht aus 2 Lösungen, die zusammengegossen werden.

Lösung 1: *)

Asparagin	8,0
Glyzerin	120,0
Acid. citric.	4,0
Kalium phosphoric. bibasic. (K_2HPO_4)	1,0
Magnesium sulfuric.	1,0
Ferrid. Ammonium citric.	0,5
Wässrige Neutralrotlösung (1 : 1000)	15,0
Aqua dest.	865,0

*) Die benutzten Chemikalien stammten immer von derselben Fabrik.

Nach vollständigem Lösen des Asparagins und der Salze werden das Glyzerin und die Farbstofflösung hinzugegeben und wie vorher auf einen pH-Wert von 6,4 durch Zusatz von Natronlauge eingestellt. Das Sterilisieren erfolgt bei 110° C. im Autoklaven eine halbe Stunde lang nachdem die Lösung auf Reagenzröhrchen zu je 5 ccm abgefüllt ist. Hiernach wird jedem Röhrchen 0,5 ccm Rinderserum zugesetzt.

Lösung 2:

Agar	15,0
Aquar dest.	1000,0

Den Agar läßt man aufquellen, verflüssigt ihn, füllt die Lösung ebenfalls auf Röhrchen mit je 5 ccm ab und sterilisiert sie.

Nährboden Nr. 4.

Lösung 1:

Wie Lösung 1 des Nährbodens Nr. 3 nur anstelle des Glyzerins dieselbe Menge Aqua dest.

Nährboden Nr. 5).**

Lösung 1:

Wie Lösung 1 des Nährbodens Nr. 4 mit einem Traubenzuckerzusatz von 4%.

Nährboden Nr. 6.

(Nach der zweiten genauen Mitteilung von L. Lange).

Lösung 1:

Sie enthält denselben Asparagin-, Glyzerin- und Salzgehalt wie Lösung 1 des Nährbodens Nr. 3, nur ist die Asparagin-Salz-Lösung durch Zusatz von reinem Ammoniak auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt und der ganzen Lösung 10% Rinderserum (also 100 ccm) zugesetzt. Nach dem Sterilisieren wird Rinderserum zugesetzt und auf Reagenzröhrchen zu je 5 ccm abgefüllt.

Nährboden Nr. 7.

(Original L.-Lange ohne Glyzerin).

Lösung 1:

Wie Lösung 1 des Nährbodens Nr. 6, nur Glyzerin durch dieselbe Menge Aqua dest. ersetzt.

Nährboden Nr. 8.

Lösung 1:

Wie Lösung Nr. 1 des Nährbodens Nr. 4, der aber nach dem Einstellen auf einen pH-Wert von 6,4 (durch Natronlauge) 4% Arabinose zugefügt wird. Der ganzen sterilen Lösung wird im Kolben 10% Rinderserum (also 100 ccm) hinzugegeben und auf Röhrchen zu je 5 ccm abgefüllt.

**) Die zuckerhaltigen Nährböden werden an drei aufeinanderfolgenden Tagen je eine halbe Stunde lang bei 100° C. im Dampftopf sterilisiert.

Nährböden Nr. 9 — Nr. 15.

Lösung 1:

Wie Lösung 1 des Nährbodens Nr. 8, aber anstelle der Arabinose 4 % eines anderen Zuckers bezw. einer Stärke.

Nährboden Nr. 9 = Laevulose
Nährboden Nr. 10 = Galaktose
Nährboden Nr. 11 = Saccharose
Nährboden Nr. 12 = Maltose
Nährboden Nr. 13 = Laktose
Nährboden Nr. 14 = Raffinose
Nährboden Nr. 15 = Glykogen

Die Lösung 2 ist für die Nährböden 3—15 die gleiche.

Für Platten enthielten zu Ende der Versuche die Nährböden Nr. 1 und Nr. 2 2 % Agar und wurden als Nährböden Nr. 1× und Nr. 2× bezeichnet.

2. Beimpfung der Röhrchen, Kontrolle des Wachstums der Keime, Verschluß der Röhrchen und Platten, Bebrütungstemperatur.

Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Keime im Kulturmedium zu erzielen, wurde das Ausgangsmaterial einer guten Homogenisierung unterworfen, ähnlich der wie sie K. A. Jensen (1932) bei tuberkulösem Material anwendet, um bei primären Kulturen die Typen besser bestimmen zu können. In sterilen kleinen Porzellan- oder Achatreibeschalen werden möglichst mehrere Ösen von Tbb. gebracht, gut verrieben, 10—11 Tropfen von normaler Natronlauge zugegeben, wieder verrieben und dann durch dieselbe Menge von normaler Salzsäure neutralisiert. Es befand sich nun etwa 1 ccm Flüssigkeit in der Reibschale.

Es wurden immer 3 Röhrchen eines jeden Nährbodens beimpft, in den ersten Versuchen gleichmäßig mit je 2 Ösen dieser Aufschwemmung, später verschieden stark und zwar das erste Röhrchen (RI) mit 2 Ösen der Aufschwemmung, das zweite Röhrchen (RII) mit 2 Ösen aus den ersten beimpften Röhrchen und das dritte (RIII) nur mit einer Öse dieser Aufschwemmung.

Wie schon oben mitgeteilt, wurden die Nährböden Nr. 1 und 2 erst nach dem Verflüssigen des Agars und dem Hinzufügen des Rinderserums beimpft, indem man sie vorher im Wasserbad bei 45° C. hielt. Durch Rollen zwischen den Handflächen und Neigen suchte ich die Keime und das Serum im ganzen Röhrchen zu verteilen.

Bei den Nährböden Nr. 3—15 beimpfte ich die Lösung 1, erwärmte sie auf 45° C. und goß sie dem vorher verflüssigten, dann auf 45° C. abgekühlten und im Wasserbad bei dieser Temperatur gehaltenen Agar (Lösung 2) hinzu und mischte die Flüssigkeiten so lange, bis sie im ganzen Röhrchen gleichmäßig verteilt waren.

Die Platten beimpfte ich genau so. Bei einigen Platten wurde die Oberfläche beimpft, aber wegen ihres geringen Agargehaltes (1 %) wurde die glatte Oberfläche leicht zerstört.

Zur Kontrolle des Wachstums der Keime wurden stets die nach Witte (1935) modifizierten Petragnani-Einährböden mit und ohne Glyzerin, die sich als besonders geeignet für das Tbb.-Wachstum erwiesen haben, beimpft, Die bovinen Stämme wurden auf den Nährboden, der kein Glyzerin enthält, gebracht, die anderen auf den glyzerinhaltigen. Die beimpften Röhrchen wurden mit Guttapercha verschlossen, nachdem der Wattestopfen tief in das Röhrchen hineingedrückt und mit der Bunsenflamme oben abgebrannt worden war. Verunreinigungen waren selten.

Die Petrischalen wurden in den ersten Versuchen auf Glasplatten gelegt und mit Plastilin verschlossen, dabei erreichte ich jedoch häufig keinen vollkommenen Verschluß. Später wurden Petrischalen mit Plastilin gut luftdicht verschlossen.

Die Bebrütungstemperatur betrug 38° C.

3. Beurteilung der Kulturen.

Das Wachstum wurde in erster Linie mit dem unbewaffneten Auge im durchfallenden Licht bei möglichst guter Beleuchtung beurteilt und erst in Zweifelsfällen wurde die Lupenvergrößerung des Mikroskopes zu Hilfe genommen. Die Plattenkulturen wurden fast ausschließlich bei Lupenvergrößerung des Mikroskopes beurteilt. Nach Größe und Anzahl der Kolonien wurde die Üppigkeit des Wachstums abgeschätzt und in der üblichen Weise mit Plus- und Minuszeichen bezeichnet.

C. DAS ZONENWACHSTUM ALS DIFFERENZIERUNGSMITTEL DER TUBERKELBAKTERIEN UND VERWANDTER SÄUREFESTER SAPROPHYTEN.

Die Untersuchungen über die säurefesten Bakterien hatten folgende Ergebnisse:

1. Das Wachstum der Tuberkelbakterien vom Typus bovinus in hoher Schicht.

In dem Nährboden Nr. 1 (doppelt konzentrierte Sautonlösung) wurden 13 Stämme des Typus bovinus z. T. wiederholt (4 Stämme) geprüft. Hiervon wuchsen 6 Stämme ohne Zone in groben Kolonien von der Oberfläche 25—30 mm in die Tiefe, 7 in zahlreichen kleinen Kolonien näher der Oberfläche. Bei 6 dieser Stämme trat das Wachstum einmal nach 12—18 Tagen in Form eines trüben Ringes in 10—13 mm Tiefe (von der Oberfläche) auf, außerdem zeigten sich oberhalb davon feine Kolonien in geringer Anzahl. Nach mehreren Wochen bildeten sich bei verschiedenen Stämmen bis zu 3 Atmungsringe oberhalb oder unterhalb des ersten aus. (Vgl. Abb. Nr. 1). Ihre Breite schwankt zwischen ½—2 mm. Bei 5 von diesen 6 Stämmen war die Ringbildung in dem Nährboden derselben Herstellungsreihe aufgetreten. Der 7. Stamm (Nr. 42) fiel durch mehrere besondere Eigenschaften auf. Er wuchs von der Oberfläche bis zu einer unscharfen Grenze 14—15 mm unterhalb der Oberfläche, dabei trat zuerst eine von oben nach unten abnehmende grauweiße Trübung auf. Nach mehreren Wochen änderte sich die Farbe der Kolonien in eine goldgelbe, das Wachstum verstärkte sich an der Oberfläche und es bildete sich weiter ein dicker, höckeriger, feuchter Be-

lag 10 mm am Glase hinauf. In der Tiefe ging die Entwicklung bald nicht weiter. (Der Stamm rief bei Meerschweinchen und Kaninchen eine generalisierte Tuberkulose hervor (zahlreiche verkäste Herde in allen Organen)).

Die Nährböden Nr. 2—5 wurden mit 7 bovinen Stämmen beimpft.

Bei der Prüfung im Nährboden Nr. 2 (doppelt konzentrierte Sautonlösung ohne Glyzerin) zeigte sich bei 6 Stämmen das Wachstum als eine fast gleichmäßige Trübung in den oberen 13—15—18 mm des Nährbodens mit einer unteren scharfen Grenze. Der andere Stamm (Stamm 54) wuchs in groben Kolonien in der oberen Nährbodenschicht ohne scharfe Grenzen nach unten. Im Nährboden Nr. 3 (einfach konzentrierte Sautonlösung mit Glyzerin) wuchsen alle 7 Stämme in groben Kolonien noch in 15—25—30 mm Tiefe.

Wie im Nährboden Nr. 2 sah ich nach 11—14 Tagen auch bei 5 Stämmen in dem Nährboden Nr. 4 (einfach konzentrierte Sautonlösung ohne Glyzerin) von der Oberfläche bis zu einer scharfen Grenze in 10—15 mm Tiefe zahlreiche feine Kolonien, ohne daß hier eine Zone stärkeren Wachstums bemerkt wurde. Bei 2 Stämmen, die durch ihre langsame Entwicklung auf den anderen Nährboden auffielen, fand sich die scharfe untere Grenze in 20 mm bezw. 17 mm Tiefe unterhalb der Oberfläche, und 3 mm tiefer hatte sich außerdem bei beiden ein schmales Zonenwachstum ausgebildet.

In dem Nährboden Nr. 6 (nach den genauen Angaben von L. Lange) wuchsen die 5 geprüften Stämme im ganzen Röhrchen, während in dem glyzerinfreien Nährboden Nr. 7 kaum Wachstum auftrat.

Fast gleichmäßig haben sich die bovinen Stämme mit Traubenzucker, Arabinose, Laevulose und Galaktose, (Nr. 5, 8, 9 und 10) verhalten, indem sie sich im oberen Teil der Nährböden in zahlreichen feinen Kolonien bis zu einer scharfen Grenze 10—15 mm tief vermehrten und am üppigsten an der unteren Grenze wuchsen, ohne aber eine ausgesprochene Zone zu bilden. Bei einem Stamm trat im Nährboden Nr. 10 eine Zone 2 mm unterhalb dieser Grenze auf.

In den polysaccharidhaltigen Nährböden Nr. 11—15 erschienen wenige grobe Kolonien noch in 20—30 mm unter der Tiefe.

2. *Das Wachstum der Tuberkelbakterien vom Typus humanus in hoher Schicht.*

Die humanen Tbb. pflegen bei ihrer größeren Wachstumsintensität in geeigneten Nährböden nach der Oberfläche hin zu wachsen,

während sie bei weniger zusagenden Nährböden auch noch größere Tiefen aufsuchen.

In den Nährböden 1—5 wurden 8 Stämme, (in Nr. 1 einige Stämme zweimal, in den Nährböden 6 und 7 4 Stämme und in den Nährböden Nr. 8—15 3 Stämme) geprüft. Gut war das Wachstum in den Nährböden Nr. 1, 3, 6 (mit Glyzerin), Nr. 5 (mit Traubenzucker) und Nr. 12 (mit Maltose). In den beiden zuckerhaltigen Nährböden und im Nährboden mit Glyzerin nach L. Lange war es etwas geringer, am besten im Nährboden Nr. 1 mit doppelt konzentrierter Sautonlösung.

Nach 7—8 Tagen war das erste Wachstum in Form einer körnigen Trübung zu erkennen, die von der Oberfläche nach der Tiefe hin abnahm und bis zu einer unscharfen Grenze 8—12 mm unterhalb der Oberfläche reichte. Nach 3 Wochen war die Trübung besonders stark nahe der Oberfläche, die Kultur begann nun am Glase hoch zu klettern. Je nach der Üppigkeit bildete sich ein dicker, gelblichweißer, trockener, matter, faltenreicher Belag, 3—10 mm an der Glaswand hinauf. In der Tiefe schritt das Wachstum bald nicht mehr weiter (vgl. Abb. Nr. 1).

In den glyzerin- und zuckerfreien Nährböden Nr. 2, 4 und 7 zeigte sich das schlechtere Wachstum in den wenigen groben Kolonien, die teilweise noch bis in 20 mm Tiefe unter der Oberfläche entstanden. Am besten war es noch im Nährboden Nr. 2 (doppelt konzentrierte Sautonlösung ohne Glyzerin), bei dem die Vermehrung nur 12—13 mm unter die Oberfläche reichte.

Die humanen Stämme verhielten sich in den Nährböden Nr. 8 (mit Arabinose) und 9 (mit Laevulose) ähnlich wie in Nährboden Nr. 12 (mit Maltose), doch war das Wachstum am Glase nur gering, während es in Nährboden Nr. 10 (mit Galaktose) bis zu einer scharfen Grenze 10—12 mm unter der Oberfläche sich entwickelte und an der unteren Grenze unter Bildung einer Zone am stärksten war. Bei den übrigen Nährböden Nr. 11, 13, 14 und 15 mit Polysacchariden und Glykogen traten grobe Kolonien in einer Tiefe von 20—30 mm unter der Oberfläche oder im ganzen Röhrchen auf. Der frisch isolierte Stamm (Nr. 56 zeigte gutes Wachstum im glykogenhaltigen Nährboden Nr. 15.

3. Das Wachstum der Tuberkelbakterien vom Typus gallinaceus in hoher Schicht.

In den Nährböden 1—5 wurden 5 Geflügeltbb.-Stämme, in den Nährböden Nr. 6 und 7 8 Stämme und in den Nährböden 8—15 3 Stämme geprüft.

Sehr auffallend ist das Bedürfnis der Geflügeltbb. für eine geeignete Kohlenstoffquelle. In den Nährböden mit geringerem Asparagin- und Salzgehalt ohne eine besondere Kohlenstoffquelle (Nr. 4 und 7) blieb das Wachstum ganz oder fast ganz aus. Sehr gut war die Entwicklung der Keime in den glyzerinhaltigen, sauren Nährböden Nr. 1 und 3. In dem alkalischen Nährboden Nr. 6 dagegen blieb es merklich zurück. 5—6 Tage nach der Beimpfung trat in Übereinstimmung mit den Angaben von L. Lange eine diffuse gleichmäßige Trübung der oberen 10—12 mm dieser sauren Nährböden mit einer scharfen unteren Grenze auf. In der 3. Woche war das Wachstum in der oberen Hälfte der Wachstumszone stärker und allmählich schob sich derselbe grauweiße Belag am Glase hinauf, wie dies auch beim Typus bovinus im Nährboden Nr. 1 beschrieben worden ist. (siehe Abb. Nr. 1). In dem schwach alkalischen Nährboden Nr. 6 (nach der genauen Vorschrift von L. Lange) trat gleichfalls eine gleichmäßige Trübung von der Oberfläche bis zu einer scharfen Grenze 10—15 mm unterhalb auf. Bei den 3 frisch isolierten Geflügelstämmen blieb das Wachstum so wie es auch L. Lange beschrieben hat. Die älteren Sammlungsstämme dagegen wuchsen später nahe der Oberfläche stärker. Verhältnismäßig gut war das Wachstum im Nährboden Nr. 2 (doppelt konzentrierte Sautonlösung ohne Glyzerin), in dem die Stämme eine diffuse Trübung oben im Nährboden (12—15 mm) hervorriefen, die später nahe der unteren scharfen Grenze besonders stark war. Nur bei einem Stamme war das stärkere Wachstum nahe der Oberfläche festzustellen.

Die Geflügelstämme haben sich im Nährboden Nr. 5 (mit Traubenzucker) ganz einheitlich verhalten. Nach 3 Wochen wuchsen alle Stämme bis zu einer scharfen Grenze 15 mm unterhalb der Oberfläche; an der unteren Grenze bildete sich eine 2 mm breite Zone stärkeren Wachstums aus. Aber nach 4—5 Wochen war sie nicht mehr zu erkennen, denn die Trübung des Nährbodens nahe der Oberfläche nahm infolge des dort stattfindenden stärkeren Wachstums mehr und mehr zu, und später entstand auf der Oberfläche ein grau-weißer, höckeriger, feuchter Belag, der sich nur wenig auch noch an der Glaswand fortsetzte.

In den Nährböden mit Arabinose, Laevulose, Galaktose und Maltose entwickelte sich an der unteren scharfen Grenze, die 10—12 mm (im Maltose-Nährboden 16—20 mm) unter der Oberfläche lag, eine Zone stärkeren Wachstums. Merkwürdigerweise traten in einem Röhrchen des Nährboden Nr. 8 noch 4 schmale scharfe Zonen in den unteren 3 mm der Wachstumsregion auf. In den übrigen Nährböden Nr. 11, 13, 14 und 15 (Saccharose, Laktose, Raffinose und Glykogen) wuchsen dieGeflügeltbb. noch in großer Tiefe des Nährbodens oder garnicht.

4. Das Wachstum der säurefesten Saprophyten in hoher Schicht.

Von den 4 Stämmen der s. S., die in Nährboden Nr. 1 gebracht worden sind, waren 3 Mycobacterium-laticola-Stämme und ein Phleum-Stamm. Während die ersteren schnell in den oberen Schichten bis zu 8—10 mm Tiefe wuchsen, bald am Glase emporkletterten und dort einen dicken, grauweißen Belag bildeten, zeigte der letztere ein langsames Wachstum im oberen Teil des Nährbodens besonders gut unter der Oberfläche mit Bildung von orangefarbenem Pigment. Erst nach 4 Wochen wuchs der Stamm am Glase empor.

In den Nährböden Nr. 2—7 wurden ein Stamm vom Mycobacterium lactivola und ein Stamm vom Mycobacterium phlei geprüft. Ein weiterer schwach säurefester saprophytischer Stamm, der in die Nährböden 1—7 gebracht worden war, entwickelte sich nicht, da er durch das Homogenisierungsverfahren anscheinend abgetötet worden war.

Der Lacticola-Stamm gedieh schnell und gut unter Alkalisierung der sauren Nährböden und besonders gut auf den glyzerin- und traubenzuckerhaltigen Nährböden Nr. 3, 5 und 6, wie es vorher bei dem Nährboden Nr. 1 beschrieben worden ist. Auch in den glyzerin- und zuckerfreien Nährböden Nr. 4 und 7 war ein üppiges Wachstum nahe der Oberfläche, aber nicht an der Glaswand festzustellen. Der Phleum-Stamm wuchs in großer Tiefe von 10—15—20 mm unter der Oberfläche und erst nach 5 Wochen in den Nährböden Nr. 3 und 5 mit Glyzerin und Traubenzucker am Glase empor. In den Nährböden Nr. 2 und 4 (ohne Glyzerin) bildete sich eine Zone stärkeren Wachstums in 10 bezw. 20 mm Entfernung von der Nährbodenoberfläche.

Ein weiterer Phleum-Stamm wurde in den Nährböden Nr. 6—15 geprüft. Dieser bildete in den verschiedenen Tiefen von 8—12 mm unter der Oberfläche in allen Nährböden mit Ausnahme des Nährbodens 14, in dem Wachstum ausblieb, eine Zone stärkeren Wachstums an der unteren Grenze, darüber schwächeres Wachstum.

Zusammenfassung der Untersuchungsbefunde über das Zonenwachstum.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Üppigkeit des Wachstums der säurefesten Bakterien von wesentlichem Einfluß darauf ist, in welcher Schicht des quererstarrten Nährbodens die Vermehrung stattfindet. Die Üppigkeit hängt wiederum ab von der Zusammensetzung des Nährbodens und von der Dauer der Züchtung der betreffenden Keime auf künstlichen Nährboden, da eine Gewöhnung an die künstlichen Nährböden eintritt.

Ein Zeichen üppigen Wachstums ist das Auftreten von zahlreichen kleinen Kolonien in geringer Entfernung, während sich bei schlechtem Wachstum wenige große Kolonien in großer Entfernung von der Nährbodenoberfläche bilden.

6 von 13 bovinen Stämmen wuchsen bei Anwendung des Nährbodens Nr. 1 (doppeltkonzentrierte Sautonlösung mit Glyzerin) in Übereinstimmung mit den Feststellungen von L. Lange zonenförmig, 12—13 mm unter der Oberfläche. Nach längerer Beobachtungszeit bildeten sich teilweise oberhalb und unterhalb der ersten Zone weitere Ringe. 5 von den 6 geprüften Stämmen, die Zonenwachstum erkennen ließen, wurden auf Nährböden derselben Herstellungsreihe gezüchtet. Bei 6 weiteren Stämmen traten in demselben Nährboden nur grobe Kolonien auf, die sich noch ziemlich tief unter der Oberfläche bildeten. Ein Stamm (42) fiel durch vorwiegendes Wachstum auf der Oberfläche und durch starke gelbe Pigmentbildung auf. In den Nährböden Nr. 2 und Nr. 4 mit doppelt und einfach konzentrierter Sautonlösung ohne Glyzerin rief das Wachstum der Tbb. vom Typus bovinus eine gleichmäßige Trübung im oberen Nährboden mit einer unteren scharfen Grenze hervor. Die bovinen Stämme zeigten in den Nährböden mit Traubenzucker, Arabinose, Fruchtzucker und Galaktose in 10 bis 15 mm Tiefe unter der Oberfläche eine Zone stärkeren Wachstums, während oberhalb eine schwächere Vermehrung stattfand. In den Nährböden mit den Polysacchariden und Glykogen wuchsen die bovinen Tbb. vorwiegend in Form weniger grober Kolonien, die sich noch weit von der Oberfläche entfernt bildeten.

Bei Tbb. vom Typus humanus konnte das von L. Lange beschriebene Zonenwachstum mit Stämmen verschiedenen Alters nicht erzielt werden. Nur im Nährboden Nr. 10 mit Galaktose bildete sich 10—12 mm unter der Oberfläche als scharfe Begrenzung nach unten eine Zone stärkeren Wachstums aus; gleichzeitig war aber auch zwischen dieser Zone und der Oberfläche deutliche Kolonienbildung vorhanden. In den Nährböden mit günstigen Kohlenstoffquellen (Nr. 1, 3, 6, mit Glyzerin; Nr. 5 mit Traubenzucker; Nr. 8 mit Arabinose; Nr. 9 mit Traubenzucker und Nr. 12 mit Maltose) zeigte sich durchgehend das beste Wachstum nahe der Oberfläche; nach 4—5 Wochen kletterten die Kolonien mehr oder weniger am Glase hinauf. In den übrigen Nährböden war das Wachstum nicht besonders üppig und nicht charakteristisch.

Die Tbb.-Stämme vom Typus gallinaceus wuchsen fast genau nach den Angaben von L. Lange. Namentlich riefen die Kulturen in den Nährböden Nr. 1 und 3 (mit einfacher und doppelt konzentrierter Sautonlösung und Glyzerin) und Nr. 6 (nach den

Langeschen Angaben) 10—15 mm unterhalb zuerst eine gleichmäßige Trübung hervor. Besonders behielten 3 frisch isolierte Geflügelstämme dieses Wachstum auch nach längerer Beobachtung bei, während 5 ältere Sammlungsstämme später ein stärkeres Wachstum nach der Oberfläche hin zeigten und am Glase heraufwuchsen. Besonders auffallend war das Wachstum im traubenzuckerhaltigen Nährboden, bei dem sich zuerst an der unteren Grenze ein zonenförmiges stärkeres Wachstum ausbildete, dann aber gegenüber dem Wachstum nahe der Oberfläche zurücktrat, wo sich das stärkste Wachstum bemerkbar machte. Hervorzuheben ist demnach, daß sich auch beim Typus gallinaceus ebenso wie beim Typus bovinus Zonen stärkeren Wachstums an der unteren Grenze der Koloniebildung feststellen ließen. Das Zonenwachstum wurde in denselben Nährböden (Nr. 8, 9 und 10 mit den Monosacchariden Arabinose, Laevulose und Galaktose) sowohl beim Typus bovinus als auch beim Typus gallinaceus regelmäßig beobachtet.

In Übereinstimmung mit den Feststellungen von L. Lange vermehrten sich die schnell wachsenden s. S. auf der Oberfläche und in den oberen Schichten der Nährböden, während die langsam wachsenden auch noch größere Tiefen (bis zu 20 mm unter der Oberfläche) aufsuchten und in den Nährböden ohne Glyzerin und den zuckerhaltigen Nährböden 8—20 mm unter der Oberfläche Zonen stärkeren Wachstums bildeten.

D. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE KOLONIEFORMEN DER TUBERKELBAKTERIEN UND DER VERWANDTEN SÄUREFESTEN SAPROPHYTEN.

Bei den ersten Kulturversuchen fielen schon mit der Lupenvergrößerung des Mikroskopes deutliche Unterschiede der Oberflächenkolonien der verschiedenen Tbb.-Typen auf, die den Anlaß zu weiteren Untersuchungen gaben. Schon an den Kulturen in hoher Schicht konnte ich bei mikroskopischer Betrachtung der Kolonien, die sich oberflächlich an der Glaswand bildeten, meistens den Typus bestimmen, selbst wenn noch im ganzen Röhrchen überhaupt makroskopisch Wachstum nicht festzustellen war.

Dagegen sind die tiefen Kolonien nicht charakteristisch. Sie haben unter dem Mikroskop eine hellbraune Farbe und himbeerförmige, geschlossene Gestalt.

Um die Oberflächenkolonien genauer unterscheiden zu können, wurden Plattenkulturen angelegt. Die Nährböden Nr. 1 und

2 mit doppelt konzentrierter Sautonlösung (mit und ohne Glyzerin) wurden zuerst verwandt. Später erhöhte ich den Agarzusatz auf 2%.

1. Die Kolonieform der Tuberkelbakterien vom Typus bovinus in Plattenkultur.

In Plattenkultur waren die Kolonien meist von verschiedener Größe; neben den makroskopisch sichtbaren fanden sich mikroskopisch wahrnehmbare. Einige Stämme fielen durch die gute Entwicklung der Einzelkolonien auf, die einen Durchmesser von 5 mm und darüber erreichen konnten, wenn nur wenige Kolonien vorhanden waren, während andere ein schlechtes Wachstum zeigten oder überhaupt nicht angingen. Von den 10 bovinen Stämmen, die auf Plattenkultur geprüft wurden, gingen 2 überhaupt nicht und 6 weitere Stämme nicht auf dem glyzerinhaltigen Nährboden Nr. 1 an. Der glyzerinhaltige Nährboden bietet also schlechte Wachstumsbedingungen für den bovinen Typus.

Mit der Lupenvergrößerung des Mikroskopes sieht man von einem kleineren oder größeren unregelmäßigen unscharf begrenzten Zentrum feine, scharf konturierte, lockenartige Fäden ausgehen. Bei jungen und sich nicht weiter entwickelnden Kolonien liegen diese Ausläufer noch verhältnismäßig weit auseinander (vgl. Abb. Nr. 2 und 4), bei alten jedoch ganz eng aneinander, ohne auch nur eine Lücke zwischen sich zu lassen (vgl. Abb. Nr. 3). In diesem Falle sind dann auch nur noch am Rande die einzelnen Ausläufer erkennbar, während der weite Hof um das Zentrum der Kolonie grauweiß ist und von dunklen, geschlängelten Linien durchzogen wird. Die ganze Kolonie zeigt die Form einer flachen kreisförmigen Scheibe mit einem feinzackigen Rande.

Im gefärbten Klatschpräparat sieht man die Bakterien ein Netzwerk aus verschiedenen dicken Zügen von parallel gelagerten Stäbchen bilden, das besonders am Rande aufgelockert ist (vgl. Abb. Nr. 5). Auffallend ist, daß alle Stäbchen im Verbande liegen.

Ein Stamm (Nr. 42), der auch schon durch seine starke Pigmentbildung und sein Wachstum an der Oberfläche und am Glase sich von den übrigen unterschied, zeigte eine hiervon abweichende Kolonieform. Schon an der Glaswand des Reagenzröhrchens zeigten sich die Kolonien von ganz feiner Tautropfenform. Erst nach 3 Wochen war auf der Platte mit dem glyzerinfreien Nährboden (Nr. 2) Wachstum zu erkennen. Die zahlreichen Tiefenkolonien erschienen bei Lupenvergrößerungen nur punktförmig. Die Oberflächenkolonien etwas größer. Nach mehreren Wochen sah die Platte im ganzen

braun aus. Bei Betrachtung mit dem Objektiv 6 L (Leitz) konnte man die sehr kleinen Oberflächenkolonien, die an Schneeflockenfiguren erinnerten, erkennen. Im gefärbten Ausstrich, der von den Oberflächenkolonien gemacht wurde, konnten die säurefesten Bakterien, die im Verbande lagen, festgestellt werden.

Bei den 19 untersuchten bovinen Stämmen beobachtete ich überall schon im Reagenzglas das Wachstum von zarten Ausläufern mit Ausnahme des oben beschriebenen Stammes. Hierbei schwimmen einmal Teile der Kolonien als einzelne Ausläufer im Kondenswasser; aber auch an der Glaswand entwickeln sich spinnenförmige Kolonien mit den geschilderten Ausläufern.

2. Die Kolonieform der Tuberkelbakterien vom Typus humanus in Plattenkultur.

Gegenüber dem bovinen Typus zeigte der humane ein recht üppiges Wachstum in den angewandten Nährböden. Im ganzen wurden 8 Stämme untersucht.

Auch für den Typus humanus ist das Wachstum mit lockenartigen Ausläufern charakteristisch, aber hier sind diese vielfach etwas dicker, nicht so scharf kontuiert; sie geben ein sehr verschwommenes Bild (vgl. Abb. Nr. 6 und 7).

Die Oberflächenkolonien weisen ebenfalls ein dunkelbraunes unregelmäßiges Zentrum, um das die Ausläufer sich als hellbrauner Hof ausbreiten, auf. Die Ausläufer sind aber nicht mehr einzeln zu erkennen. Während beim Typus bovinus die Oberfläche mehr einen ebenen, gleichmäßig welligen Eindruck macht, ist sie hier stark zerklüftet und wegen der stärkeren unregelmäßigen Erhebungen mit einem Faltengebirge zu vergleichen. Nur am Rande sind die Ausläufer noch zu erkennen. Häufig konnte ich beobachten, wie eine himbeerförmige Tiefenkolonie die Oberfläche erreichte und dann die lockenartigen Ausläufer auf der Oberfläche des Nährbodens ausschickte und zur Oberflächenkolonie wurde.

In der Abb. Nr. 8 ist eine große Kolonie, die sich völlig freiliegend auf der Platte nach 26 Tagen zu der Größe von 7 mm Durchmesser entwickelt hatte, sichtbar, während die anderen Kolonien kein abweichendes Bild aufwiesen. Ihre Farbe war graugelb. Aber bei der großen Kolonie war bei genauem Hinsehen auch am Rande das lockenartige Wachstum zu sehen.

Das Klatschpräparat klärt darüber auf, wie das verschwommene Bild der Ausläufer der Tbb.-Kolonien des Typus humanus zustande kommt; denn es finden sich hier an der Begrenzung der Ausläufer die Bakterien nicht parallel der Hauptrichtung der Ausläufer ange-

ordnet, sie liegen vielfach im Gegensatz zu dem Bilde beim Typus bovinus ungeordnet (vgl. Abb. Nr. 5 und 9). Im übrigen bilden die humanen Tbb. ein ähnliches Netzwerk wie die bovinen.

3. Die Kolonieformen der Tuberkelbakterien vom Typus gallinaceus in Plattenkultur.

Während beim bovinen und humanen Typus in biologischer Beziehung z. B. durch die gleichartige Tuberkulinwirkung und in botanischer Beziehung durch viele ähnliche Merkmale eine größere Verwandtschaft bewiesen wird, so zeigen auch die Oberflächenkolonien der Geflügeltbb.-Stämme ein ganz anderes Bild als die vorher beschriebenen humanen und bovinen.

Auf Plattenkulturen wurden 10 Stämme geprüft und zeigten immer Oberflächenkolonien von demselben Wachstumstypus. Das Wachstum in dem glyzerinfreien Nährboden blieb immer sehr stark hinter dem glyzerinhaltigen zurück. Die Geflügeltbb. bilden kleine, runde, makroskopisch zuerst zarte, blauschimmernde Oberflächenkolonien. Mikroskopisch sieht man runde, hellbraune, ziemlich ebene, geschlossene Kolonien mit einem dunklen Zentrum und nicht scharf begrenztem Rand. Sie fallen durch ihre erhebliche Größe gegenüber den Tiefenkolonien deutlich auf. (Vgl. Abb. Nr. 10). Von 2 Stämmen wurden Oberflächenkulturen angelegt, die dann auch nur die charakteristischen Merkmale zeigten (vgl. Abb. 11).

Im gefärbten Klatschpräparat zeigen die Bakterien keine besondere Anordnung. In der Mitte bis fast zum Rande der Kolonie ist überhaupt nur ein gleichmäßig rotes Gebilde zu sehen. Am Rande liegen die Bakterien regellos durcheinander, und über das ganze Präparat verstreut kann man einzelne Stäbchen finden (vgl. Abb. 12).

4. Die Kolonieformen der säurefesten Saprophyten.

Gegenüber den pathogenen Bakterien erschienen die Kolonien der 6 Lacticola-Stämme und des Stammes 35, der nicht genauer bestimmt wurde, schon nach 2—4 Tagen in großer Anzahl, während 4—10 Tage vergingen, bis die ersten Kolonien der 3 Phleumstämme erkennbar waren.

Die Oberflächenkolonien der Phleumstämme unterscheiden sich von denjenigen des Typus gallinaceus nicht. Auch hier haben wir die runden, kleinen, hellbraunen, fast homogenen Oberflächenkolonien mit dem dunklen, ziemlich scharf begrenzten Zentrum und dem nicht ganz scharf konturierten Rand. Ebenso gibt das gefärbte Klatschpräparat keine Unterscheidungsmerkmale (vgl. Abb. Nr. 14).

Da sich die Phleumstämme meist ebenso langsam wie die Geflügeltbb. entwickeln, ist auch die scharfe Abgrenzung durch Beurteilung der Oberflächenkolonien nicht möglich.

Schon größere Unterschiede bestehen bei den Oberflächenkolonien des Mycobacterium lacticola planum gegenüber denen des Typus gallinaceus. Wenn nur wenige Kolonien auf der Platte vorhanden sind, bilden sich flache, runde, hellbraune Kolonien mit einem kleinen Zentrum von einer Größe, wie man sie niemals bei Geflügeltbb.-Kolonien beobachtet. Ihre Grenzen sind so verschwommen, daß sie häufiger unter dem Mikroskop nicht erkennbar sind. In der Abbildung 13 (Stamm 4) sind die Kolonien vom Mycobacterium lacticola planum, die durch sehr große Ähnlichkeit mit denen des Typus gallinaceus auffallen, abgebildet. In den glyzerinfreien Nährböden hatte der Stamm 4 den oben beschriebenen charakteristischen weiten Hof, auf dem glyzerinhaltigen dagegen den schmalen Hof, wie die Abbildung 13 zeigt.

Im gefärbten Klatschpräparat sieht man die Kolonien des Mycobacterium lacticola planum nur als rote homogene Masse, an deren Rand die ungeordnet liegenden Stäbchen liegen.

Ein charakteristisches Bild, das mit keiner Oberflächenkolonie der Tbb.-Typen verwechselt werden kann, bietet die Oberflächenkolonie des Mycobacterium lacticola perrugosum (vgl. Abb. 15).

Die hellgraue, granulierte Kolonie breitet sich flach aus, hat einen unregelmäßigen zerfressenen Rand und ein kleines, dunkles Zentrum, das auch fehlen kann. Eine große Ähnlichkeit mit den Oberflächenkolonien der humanen Tbb. fällt im gefärbten Klatschpräparat bei dem lückenhaften Rand auf, aber die Stäbchen sind kürzer, kokkenartig und zeigen keine bestimmte Anordnung, wie dies bei den humanen Tbb. der Fall ist.

In der Plattenkultur eines Stammes (Nr. 29) waren sowohl Mycobacterium lacticola planum als auch perrugosum vorhanden.

Die Oberflächenkolonien des Stammes 35 zeigen ein besonderes Bild. Die ganz zarten hauchartigen, makroskopisch hellgrau erscheinenden Kolonien beiten sich flach aus. Unter dem Mikroskop sieht man runde, hellbraune, dunkelpunktierte Kolonien mit einem kleinen dunklen Zentrum und einem unregelmäßigen Rand, an dem man nur beim genauen Einstellen feine Ausläufer erkennen kann (vgl. Abb. Nr. 17). Wenn man nur das gefärbte Klatschpräparat der Oberflächenkolonien sieht, so kann man recht gut an Kolonien von bovinen Tbb. denken (vgl. Abb. Nr. 18 und 5). Auch hier sieht man ein Netzwerk aus verschiedenen dicken Fäden, das besonders am Rande recht zart ist. In beiden Fällen liegen die Stäbchen nur im Verbande.

Zusammenfassung der Untersuchungen über die Oberflächenkolonien der Tuberkelbakterien und der säurefesten Saprophyten.

Im Oberflächenwachstum der Säugetiertbb. einerseits und der Geflügeltbb. anderseits wurden auffallende Unterschiede festgestellt. Während die Geflügeltbb. kleine, runde, hellbraune, geschlossene Oberflächenkolonien mit einem dunklen Zentrum bilden, bilden die Kolonien der Säugetiertbb. lockenartige Ausläufer, die von einem dichten unregelmäßigen Zentrum ausgehen und bei allen Kolonien nur noch am Rande zu erkennen sind. Die Oberflächenkolonien der bovinen Tbb. unterscheiden sich wiederum von den humanen durch die schärfer begrenzten zarteren Ausläufer.

Bei einem bovinen Stamm fanden sich winzig kleine Kolonien, die an Schneeflockenfiguren erinnerten.

Eine scharfe Abgrenzung der Geflügeltbb. gegenüber den s. S. auf Grund des Oberflächenwachstums war nicht in allen Fällen möglich. Große Ähnlichkeit mit den Geflügeltbb.-Kolonien besitzen die Oberflächenkolonien des Mycobacterium phlei, weniger jedoch die des Mycobacterium lacticola planum, die meistens viel größer werden und früher auftreten.

Das Mycobacterium lacticola perrugosum ist an seinen charakteristischen, graugranulierten, unregelmäßig begrenzten Oberflächenkolonien zu erkennen.

E. DIE PRÜFUNG DER WIRKUNG EINER REIHE VON ZUCKERARTEN IM SAUTONNÄHRBODEN, MODIFIZIERT NACH L. LANGE, AUF DAS WACHSTUM DER TUBERKELBAKTERIEN.

Die ersten Versuche hatten gezeigt, daß der Zusatz von Traubenzucker zu dem Sautonagar eine günstige Wirkung auf das Wachstum der Tbb. ausübt, namentlich auf das der humanen und der Geflügeltbb.

In die Nährböden Nr. 6—15 wurden 3 Stämme eines jeden Tbb.-Typus und ein sehr langsam wachsender Phleum-Stamm gebracht. Außer den Nährböden Nr. 6 und 7 (nach den genauen Angaben von L. Lange mit und ohne Glyzerin) erhielten die Nährböden je einen 2%igen Zusatz einer Auswahl von Zuckern und Glykogen.

1. Das Verhalten der Tuberkelbakterien vom Typus bovinus in zuckerhaltigen Nährböden.

Der Typus bovinus wurde in seinem Wachstum durch Arabinose, Laevulose, Galaktose und auch Traubenzucker, wie bereits anfangs festgestellt worden war, gefördert. Bei Zusatz der genannten Zucker wurde günstiges Wachstum in Form zahlreicher feiner Kolonien namentlich 12—13 mm unter der Oberfläche erzielt, während die Stämme im Nährboden nach L. Lange mit Glyzerin und in den Nährböden mit Sacchararose, Maltose, Laktose, Raffinose und Glykogen kümmerliches Wachstum (wenige grobe Kolonien) erkennen ließen. In dem Nährboden nach L. Lange ohne Glyzerin zeigte sich kaum Wachstum.

2. Das Verhalten der Tuberkelbakterien vom Typus humanus in zuckerhaltigen Nährböden.

Wie auch Frouin und Guillaumie (1924) festgestellt haben, rief die Gegenwart von Maltose bei humanen Stämmen ein sehr üppiges Wachstum hervor. Die Kolonien wuchsen noch weit an der Glaswand empor und zeigten in diesem Nährboden noch etwas besseres Wachstum als in dem glyzerinhaltigen nach L. Lange. Auch im traubenzuckerhaltigen Nährboden, in dem früher 8 Stämme geprüft wurden, war eine gute Entwicklung der humanen Tbb. zu bemerken, allerdings etwas geringer als im glyzerinhaltigen. Bei Gewart von Arabinose, Laevulose und Galaktose war die Vermehrung nur mäßig .Schlecht war das Wachstum in den Nährböden mit Saccharose, Laktose, Raffinose und Glykogen, mit Ausnahme eines frisch isolierten Stammes (Nr. 56), der auch im Nährboden mit Glykogen an der Glaswand üppig empor wuchs.

3. Das Verhalten der Tuberkelbakterien vom Typus gallinaceus in zuckerhaltigen Nährböden.

In diesem Versuch wurden nur ganz frisch herausgezüchtete Stämme benutzt. In den Nährböden mit Arabinose, Laevulose und Gelaktose glich das Wachstum demjenigen des Nährbodens nach L. Lange mit Glyzerin, nur bildeten sich in den zuckerhaltigen Nährböden Zonen stärkeren Wachstums in der Tiefe. In dem Langeschen Nährboden trübte sich der obere Teil gleichmäßig, wie vorher schon beschrieben wurde. Nur schlecht vermehrten sich die Keime bei Anwesenheit von Maltose und Laktose, während bei

Gegenwart von Saccharose, Raffinose, Glykogen und im Nährboden nach L. Lange ohne Glyzerin das Wachstum fast völlig ausblieb.

Zum Vergleich wurde ein s. S. auf demselben Nährboden geprüft. Dabei ergab sich, daß die Monosaccharide Arabinose, Laevulose und Galaktose fast dasselbe Wachstum bedingen wie Glyzerin. Bei den Polysacchariden ist die Vermehrung gering.

Zusammenfassung über die Untersuchungsbefunde zur Prüfung der Wirkung der Zucker auf das Tuberkelbakterienwachstum.

Bei je 3 Stämmen der verschiedenen Tbb.-Typen wurde festgestellt, daß die Monosaccharide Arabinose, Traubenzucker, Fruchtzucker und Galaktose bei 2%igem Zusatz im Sautonnährboden, modifiziert nach L. Lange, eine fördernde Wirkung auf das Tbb.-Wachstum ausübten. Besonders hervorzuheben ist, daß bei Traubenzuckergegenwart ein gutes Wachstum der humanen sowie der Geflügeltbb. erzielt wurde.

Von den Polysacchariden bewirkte nur Maltose sehr gute Vermehrung der humanen Tbb., während die Nährböden mit Saccharose, Maltose, Laktose und Raffinose (mit der vorerwähnten Ausnahme) bei allen 3 Tbb.-Typen ein schlechtes oder gar kein Wachstum erkennen ließen. Auch bei Glykogenzusatz war die Vermehrung nur gering oder blieb aus, mit Ausnahme eines humanen Stammes, der gut in glykogenhaltigem Nährboden wuchs.

F. KRITISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER UNTERSUCHUNGSBEFUNDE.

Das von L. Lange beschriebene Zonenwachstum im festen Sautonnährboden konnte beim Typus bovinus 6 mal beobachtet werden. Die Erscheinung trat demnach nur bei einem Teil der Stämme und bei diesen auch nur bei einzelnen Nährböden auf. Oberhalb und unterhalb vom ersten Atmungsring können sich weitere hinzubilden. Außer dem von L. Lange beschriebenen Wachstum in Formen eines Atmungsringes wurde bei Tbb.-Stämmen vom Typus bovinus eine gleichmäßige Trübung der oberen Nährbodenschicht mit einer unteren scharfen Grenze (14—15 mm unter der Ober-

fläche) beobachtet. Diese Art des Wachstums ist nach L. Lange kennzeichnend für Geflügeltbb. In den übrigen Nährböden zeigten diese Stämme die charakteristischen Merkmale der bovinen Tbb. (dysgonisches Wachstum, Bevorzugung glyzerinfreier Nährböden, Wachstum in Form von Körnchen in dem Besredka-Einährboden). Eine dritte Form der Vermehrung wurde im festen Sautonnährboden mit Zusatz von Traubenzucker Arabinose, Fruchtzucker oder Gelaktose beobachtet. Hier wurde 10—15 mm unter der Oberfläche eine Zone stärkeren Wachstums festgestellt, bei deutlicher, wenn auch schwächerer Koloniebildung zwischen der Zone und der Oberfläche. Bei Zusatz von Saccharose, Maltose, Laktose, Raffinose und Glykogen blieb das beschriebene Wachstum aus.

In den Versuchen mit dem Typus humanus wurde lediglich in einem Nährboden (mit Galaktose) Zonenwachstum erzielt. Im übrigen wurde meist Oberflächenwachstum bei üppiger Vermehrung oder Bildung einzelner grober Kolonien in unregelmäßiger Verteilung unter der Oberfläche festgestellt. Hier weichen meine Befunde von denen L. Langes ab. Da die Vorschriften genau eingehalten und verschieden alte Kulturen verwendet wurden, kann eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse nicht gefunden werden.

Wesentliche Übereinstimmung bestand bei meinen Versuchen mit den Befunden von L. Lange hinsichtlich des Wachstums der Geflügelstämme, dies gilt namentlich für frisch isolierte Kulturen. Ein gewisser Unterschied wurde nach der Richtung hin festgestellt, daß bei einigen Stämmen und Nährböden außer dem gleichmäßigen Wachstum von der Oberfläche aus nach unten hin eine Zone stärkeren Wachstums auftrat, über die nach unten hin Wachstum nicht mehr beobachtet wurde. Die Angaben L. Langes, hinsichtlich der s. S. wurden, soweit die Vermehrung der schnellwachsenden Saprophyten in Frage kommt, bestätigt (Mycobacterium lacticola). Dagegen wuchsen abweichend die sich langsam vermehrenden Phleum-Stämme, und zwar in einer Tiefe bis zu 20 mm unter der Oberfläche. Fast durchgehend wurden Atmungsringe in den Sautonnährböden ohne Glyzerin und bei Zusatz von verschiedenen Zuckern erzeugt.

Nach diesem Ergebnis ist das wissenschaftlich so interessante Zonenwachstum nicht geeignet, bei der praktischen Differenzierung der säurefesten Bakterien herangezogen zu werden, da das charakteristische Wachstum nicht regelmäßig genug auftritt und Übergänge vorkommen. Namentlich gilt dies für die Abgrenzung der langsam wachsenden Phleumstämme von den Geflügeltbb.-Stämmen.

Was die Oberflächenkulturen auf Sautonnährböden anbetrifft, so wurden bisher noch nicht beobachtete auffällige Unterschiede in der Kolonieform festgestellt, die bei Anlage von Platten-

schüttelkulturen besonders schön auftraten. Namentlich zeichneten sich die Geflügeltbb. einerseits durch die Bildung geschlossener, runder Oberflächenkolonien vor den Säugetiertbb. aus, die Kolonien mit lockigen Ausläufern bildeten. Diese Unterschiede waren bei allen Stämmen auffällig. Auch im Wachstum der bovinen und humanen Tbb. ließen sich gewisse feinere Unterschiede erkennen, und zwar bildeten bovine Tbb.-Kolonien zartere Ausläufer als die humanen.

In vielen Fällen läßt sich auf Grund der Oberflächenkulturen auf Sauton agarschüttelplatten auch eine Abgrenzung der s. S. von den Geflügeltbb. ermöglichen. Namentlich trifft dies zu für das Mycobacterium lacticola perrugosum. Beim Mycobacterium lacticola planum kommen dagegen Kolonieformen vor, die an Geflügeltbb. erinnern, allerdings unterscheiden sich die Bakterien durch sonstige kulturelle Merkmale (lebhaftes Wachstum) von den pathogenen Bakterien. Anlaß zur Verwechslung mit Geflügeltbb. gibt dagegen das Mycobacterium phlei, das bei Vorbehandlung mit Mineralsäuren ein stark verzögertes Wachstum zeigen kann. Eine gewisse Unterscheidung ist auch hier durch die starke Bildung eines orangefarbenen Pigments gegeben. Die Geflügeltbb. lassen so starke Pigmentbildung vermissen.

Bekanntlich wird bei den humanen und den Geflügeltbb. das Wachstum durch Glyzerin gefördert, während die bovinen Stämme namentlich bei der Erstkultur auf glyzerinhaltigen Nährböden nicht oder nur kümmerlich wachsen. Ich habe nun die Frage geprüft, ob nicht durch bestimmte Zuckerarten eine Verbesserung des Wachstums der bovinen Tbb. erzielt werden kann. In meinen Versuchen ergab sich, daß Traubenzucker Arabinose, Laevulose und Gelaktose eine mäßige Förderung erkennen ließen. Das Wachstum der humanen Tbb. wurde außer durch Glyzerin durch Maltose und Traubenzucker gefördert. Der Zusatz von Maltose kam in seiner Wirkung demjenigen von Glyzerin gleich. Eine wesentliche Förderung des Wachstums der bovinen Tbb. durch verschiedene Zuckerarten war nicht zu erreichen. Die Vermehrung der Geflügeltbb. wurde durch Traubenzucker begünstigt; jedoch blieb hier das Wachstum gegenüber den glyzerinhaltigen Nährböden zurück.

IV. SCHLUSSSÄTZE.

1. Die Tbb. vom Typus bovinus zeigen auf den nach L. Lange modifizierten Sauton nährböden Zonenwachstum; allerdings treten diese Atmungsringe nicht regelmäßig bei allen Stämmen und nicht in allen Nährböden auf. Auch findet bei den Stämmen mit Zonenwachstum eine Vermehrung oberhalb dieser Zone statt.

2. Beim Typus humanus wurde das Zonenwachstum nur ausnahmsweise im Nährboden mit Zusatz von Galaktose festgestellt.

3. Von den Geflügeltbb. zeigten die frisch isolierten Stämme das von L. Lange beschriebene Wachstum zwischen der Oberfläche und einer unteren scharfen Grenze. Gewisse Abweichungen ergaben sich bei einigen Nährböden insofern, als auch an der unteren Grenzlinie Zonen stärkeren Wachstums in der Tiefe des Nährbodens erkennbar waren; demnach sind Übergänge zum Wachstum der Säugetiertbb. vorhanden.

4. Hinsichtlich des Wachstums des Mycobacteriums lacticola wurden die Angaben von L. Lange bestätigt. Dagegen kann sich das Mycobacterium phlei ähnlich wie die Geflügeltbb. im L. Langeschen Nährboden entwickeln.

5. Oberflächenkulturen auf festen Sautonnährböden zeigen zum Teil charakteristische Unterschiede der verschiedenen säurefesten Bakterienarten.

6. Maltose und Traubenzucker förderten das Wachstum der humanen Tbb., während das Wachstum der Geflügeltbb. nur durch Traubenzucker begünstigt wurde. Die Vermehrung der bovinen Tbb. wird durch Zusatz von Traubenzucker, Arabinose, Laevulose und Galaktose in geringem Maße gesteigert.

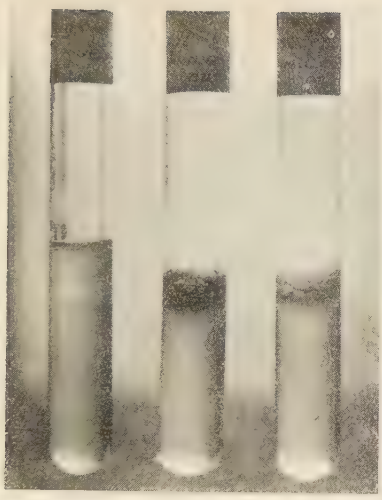

Abb. 1.

a) Wachstum des Typus bovinus in Sautonagar (3 Atmungsringe)
b) Oberflächenwachstum des Typus humanus (im gleichen Nährboden).
c) Dasselbe beim Typus gallinaceus.

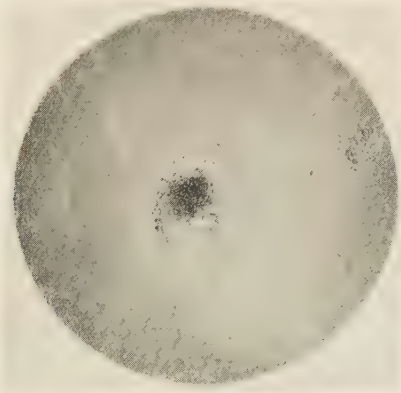

Abb. 2.

Kleine Oberflächenkolonie auf Sautonagar.
Stamm 60 — 21 Tage alt — Vergrößerung: 56fach.
Typus bovinus
Feine Ausläufer.

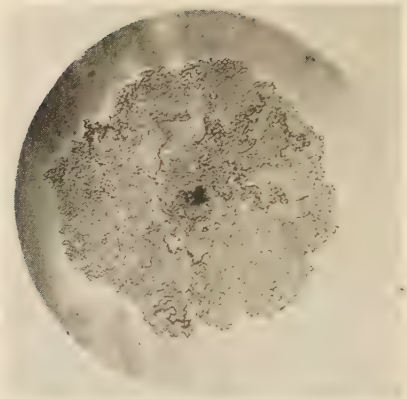

Abb. 3.

Große Oberflächenkolonie auf S a u t o n agar.
Stamm 22 — 6 Wochen alt — Vergrößerung: 27 fach.
T y p u s b o v i n u s
Flache Ausläufer, dicht geschlossen.

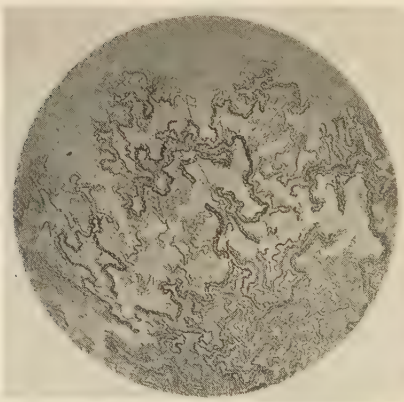

Abb. 4.

Große Oberflächenkolonie auf S a u t o n agar.
Stamm 61 — 21 Tage alt — Vergrößerung: 56 fach.
T y p u s b o v i n u s
Randzone.

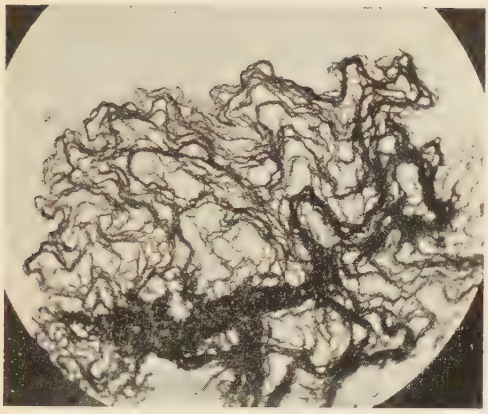

Abb. 5.

Klatschpräparat der Randzone.
Stamm 61 — 4 Wochen alt — Vergrößerung: 250 fach.
Typus bovinus
Regelmäßige Lagerung der Tuberkelbakterien in der Richtung der Ausläufer.

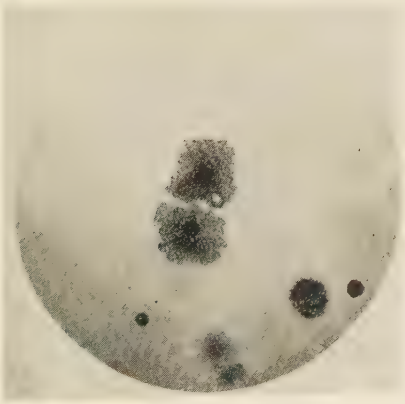

Abb. 6.

Kleine Oberflächenkolonie auf Sauton agar.
Stamm 44 — 21 Tage alt — Vergrößerung: 55 fach.
Typus humanus.

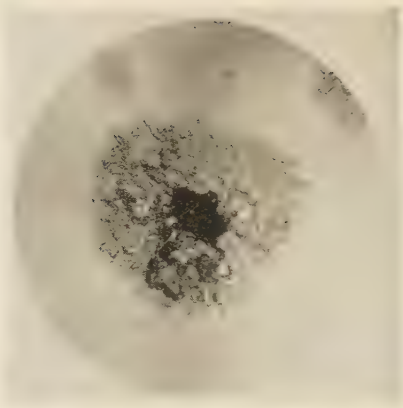

Abb. 7.

Oberflächenkolonie auf S a u t o n agar.
Stamm 45 — 6½ Wochen alt — Vergrößerung: 55 fach.
T y p u s h u m a n u s.
Ausläufer verschwommen. Faltengebirgsartige Erhebungen im Verlauf der Bakterienzüge.

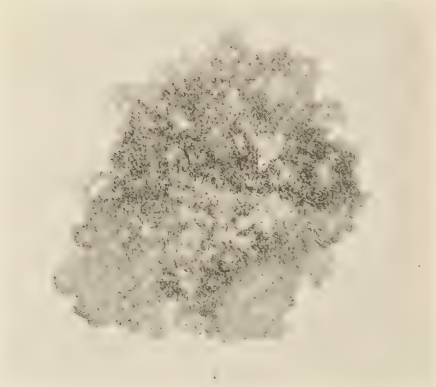

Abb. 8.

Große Oberflächenkolonie auf S a u t o n agar.
Stamm 56 — 21 Tage alt — Vergrößerung: 27 fach.
T y p u s h u m a n u s.
Unscharfe Ausläufer, deutliche Erhebungen.

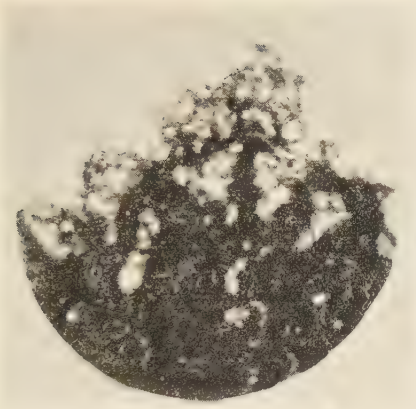

Abb. 9.

Klatschpräparat einer Oberflächenkolonie auf S a u t o n agar.
T y p u s h u m a n u s .
Stamm 47 — Wochen alt — Vergrößerung: 500 fach.
Unregelmäßige Lagerung der Bakterien.

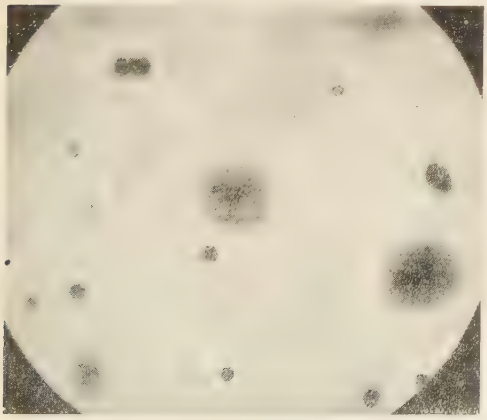

Abb. 10.

Oberflächenkolonie auf S a u t o n agar.
Stamm 58 — 23 Tage alt — Vergrößerung: 56 fach.
T y p u s g a l l i n a c e u s
Geschlossen leicht gekörnte Kolonien.

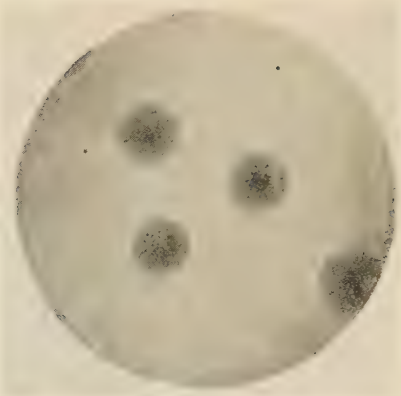

Abb. 11.

Oberflächenkolonie auf S a u t o n agar.
Stamm 15 — 20 Tage alt — Oberflächenbeimpfung — Vergr.: 55 fach.
T y p u s g a l l i n a c e u s
Geschlossene, leicht gekörnte Kolonien.

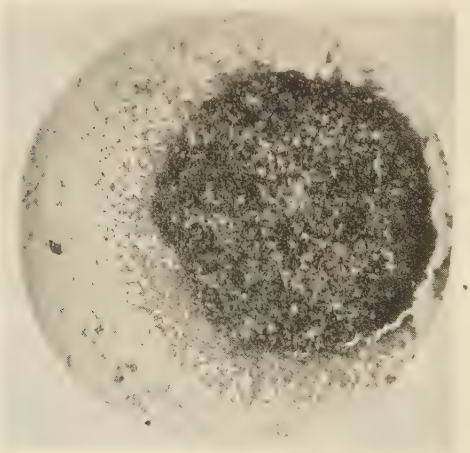

Abb. 12.

Klatschpräparat einer Oberflächenkolonie auf S a u t o n agar.
Stamm 23 — 8 Wochen alt — Vergrößerung: 450 fach.
T y p u s g a l l i n a c e u s
Keine Ausläufer, Bakterien unregelmäßig gelagert.

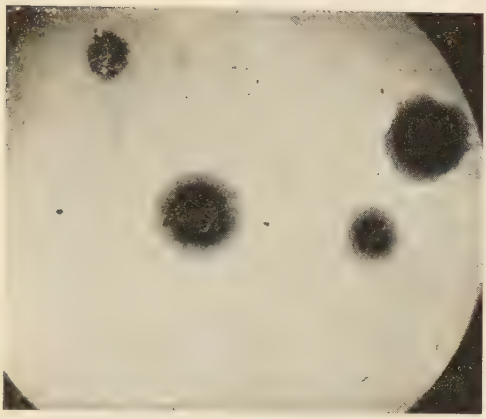

Abb. 13.

Oberflächenkolonie auf Sauton agar.
Stamm 4 — 9 Tage alt — Vergrößerung: 56 fach.
Mycobacterium lacticola planum
Kolonieform wie Abb. 11.

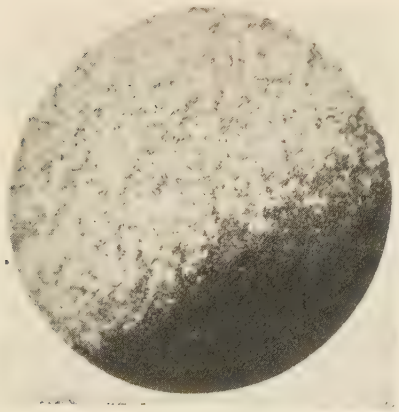

Abb. 14.

Klatschpräparat einer Oberflächenkolonie auf Sauton agar.
Stamm 30 — 8 Wochen alt — Vergrößerung: 450 fach.
Mycobacterium phlei.

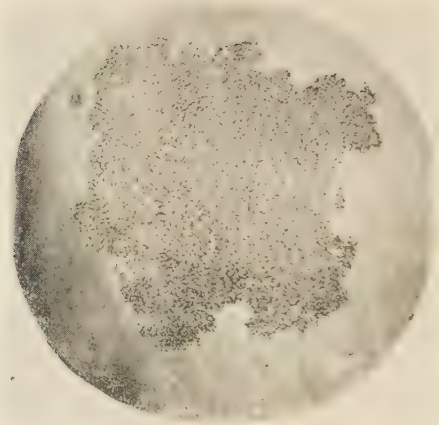

Abb. 15.

Oberflächenkolonie auf S a u t o n agar.
Stamm 37 — 9 Tage alt — Vergrößerung: 56 fach.
Mycobacterium lacticola perrugosum.

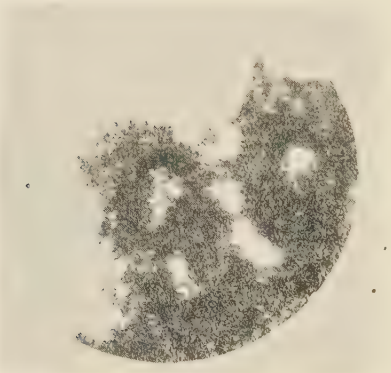

Abb 16.

Klatschpräparat einer Oberflächenkolonie.
Stamm 37 — 9 Tage alt — Vergrößerung: 500 fach.
Mycobacterium lacticola perrugosum.

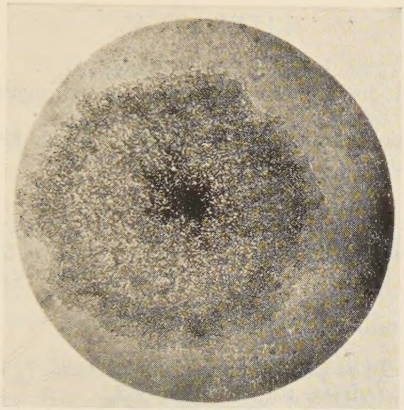

Abb. 17.

Oberflächenkolonie auf S a u t o n agar.
Stamm 35 — 9 Tage alt — Vergrößerung: 56 fach.

Abb. 18.

Klatschpräparat einer Oberflächenkolonie auf S a u t o n agar.
Stamm 35 — 9 Tage alt — Vergrößerung: 450 fach.

LITERATUR.

1. Alessandrini, A.: Zbl. f. Bakt. Ref. 1927, **84**, 121.
2. Braun, H.: Methoden zur Untersuchung von pathogenen Bakterien. 1930, Urban und Schwarzenberg.
3. Braun, H. u. Guggenheim, K.: Zbl. f. Bakt. Orig. 1933, **27**, 97.
4. Braun, H. u. Seigo Kondo: Kli. Wo. 1924, **3**, 10.
5. Dahmen, H.: T. R. 1932, **38**, 373.
   — T. R. 1933, **39**, 546.
6. Dieckmann, H. u. Mohr, H.: Zbl. f. Bakt. Orig. 1933, **129**, 185.
7. Englische Tuberkulose-Kommission zit. n. Möllers, B.: In Kolle, Kraus, Uhlenhuth, Hdb. d. pathog. Mikroorg. 1928, V2, 663.
8. Flückiger, G.: B. T. W. 1933, **43**, 72.
9. Frouin, A. u. Guillaumie, M.: Bull. Soc. Chim. biol. Paris 1926, Nr. 10. S. 1178.
10. Gardner, A. D.: J. of pathol. and bakt. 1929, **32**, 715.
11. Henley, G.: Zbl. f. Bakt. Ref. 1929, **95**, 65.
12. Helm, R.: Zbl. f. Bakt. Orig. 1933, **127**, 73.
13. Hohn, J.: Zbl. f. Bakt. Orig. 1926, **98**, 460; Kli. Wo. 1931, **10**, 2251.
14. Jensen, K. A.: Zbl. f. Bakt. Orig. 1932, **125**, 222.
15. Kallos, P. u. Kallos-Deffner, L.: Zbl. f. Tbf. 1935, **42**, 1.
16. Kauffmann, F.: Zschr. f. Hyg. 1933, **114**, 121.
17. Kirchner, O.: Beitr. z. Klin. d. Tb. 1928, **68**, 708.
18. Koch, K. und Schütz: Arch. f. wiss. u. prakt. Thkd. 1902, **28**, 169.
19. Lange, L.: Beitr. z. Klin. d. Tb. 1928, **68**, 680.
   — Zbl. f. Bakt. Orig. 1933, **127**, 10.
20. Ledoux-Lebard: Arch. de Médec. expérim. et d'anat. patholog. 1898.
21. Lehmann-Neumann: Bakteriologische Diagnostik 1926, I. Bd.: Atlas Tab. 56 und 57 und 1927 II. Bd. Text. 760. Lehmann-Münch.
22. Löwenstein, E.: Vorlesung über Tuberkulose 1920.
23. Maffucci, A.: Zschr. f. Hyg. 1892, **11**, 445.
24. Matthies, Th.: Kli. Wo. 1928, **7**, 351.
25. Mayer, A.: Zbl. f. Bakt. Ref. 1934, **114**, 547.
26. Miehe, H.: Zschr. f. Hyg. 1909, **62**, 131.
27. Oerskov, J.: Investigations into the morphology of the ray fungi. Copenhagen 1923.
   — Levin and Mundsgaard; Zbl. f. Bakt. Orig. 1932, **123**, 271.
28. Proskauer, B. u. Beck, M.: Zschr. f. Hyg. 1894, **18**, 128.
29. Sanfelice, F.: Zbl. f. d. ges. Hyg. 1925, **10**, 442.
30. Seiffert, W.: Zschr. f. Imm. Forsch.
31. Sumiyoshi, J.: Zschr. f. Tb. 1924, **39**, 333; 1924, **40**, 338.
32. Van Riemsdijk, M.: Zbl. f. Bakt. Orig. 1930, **118**, 460. Zbl. f. Bakt. 1933, **128**, 505; 1933/34, **130**, 247; 1934, **132**, 292.
33. Vollum, R.: Zschr. f. Imun. Forsch. 1932, **74**, 327.
34. Weber, A.: Arb. a. d. Kaiserl. Ges. amt 1903, **19**, 251.
35. Weber, A. u. Bofinger, H.: Tbk.-Arb. a. d. Kaiserl. Ges. amt 1904 T. 83.
36. Witte, J.: Zschr. f. Infekt. Kr. d. Haustiere 1935, **48**, 14.
37. Wolters, K. L.: D. T. W. 1930, **38**, 630.
38. Wolters, K. L. u. Dehmel, H.: Zbl. f. Bakt. Orig. 1930, **117**, 412.
39. Zwick, W.: Zschr. f. Inf.-Krk. 1908, Bd. 4, S. 161—200 und 321—373.

LEBENSLAUF

Ich bin am 16. 5. 1909 als Sohn des Bauern Bernhard Hemmert-Halswick zu Gahlen bei Wesel geboren worden. Nach dem Besuch des Gymnasiums zu Dorsten legte ich 1930 dort meine Reifeprüfung ab. Ich studierte an der Universität Gießen und an der Tierärztlichen Hochschule zu Hannover. In Gießen bestand ich am Ende des Wintersemesters 1931/32 die tierärztliche Vorprüfung und im Wintersemester 1934/35 das tierärztliche Staatsexamen. Hieran anschließend beschäftigte mich die Anfertigung dieser Doktorarbeit ein halbes Jahr. Am 8. November 1935 legte ich die mündliche Doktorprüfung vor der veterinär.-medizinischen Fakultät in Gießen ab.